

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/001199

International filing date: 28 January 2005 (28.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-022532
Filing date: 30 January 2004 (30.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 March 2005 (24.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

31. 1. 2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 1 月 3 0 日

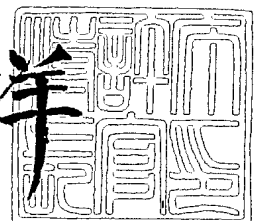
出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 2 2 5 3 2
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 0 2 2 5 3 2]

出 願 人
Applicant(s): 麒麟麦酒株式会社

2 0 0 5 年 3 月 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 2003-0094
【提出日】 平成16年 1月30日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12Q 1/02
C12C 1/00
C12G 3/12

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1 - 1 3 - 5 キリンビール株式会社
基盤技術研究所内
【氏名】 小川 俊也

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1 - 1 3 - 5 キリンビール株式会社
基盤技術研究所内
【氏名】 小泉 英樹

【特許出願人】
【識別番号】 000253503
【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社
【代表者】 荒蒔 康一郎

【代理人】
【識別番号】 100107984
【弁理士】
【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【選任した代理人】
【識別番号】 100102255
【弁理士】
【氏名又は名称】 小澤 誠次

【選任した代理人】
【識別番号】 100118957
【弁理士】
【氏名又は名称】 岡 晴子

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 044347
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0206725

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

以下のステップからなることを特徴とする醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法。

- 1) 対数増殖後期或いはそれ以降の酵母を調製するステップ、
- 2) 被検原料サンプルの水抽出高分子画分を調製するステップ、
- 3) 1) のステップで調製した酵母と、2) のステップで調製した高分子画分を、バッファー液中で混合、懸濁するステップ、
- 4) 3) ステップで混合、懸濁した酵母の沈降度合いを測定するステップ。

【請求項 2】

1) のステップにおいて調製した酵母が、酵母を培養し、対数増殖後期或いはそれ以降の酵母を回収したものであるか、或いは、該回収した酵母を更に凍結保存したものであるかを特徴とする請求項 1 記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法。

【請求項 3】

回収した酵母を、E D T A で洗浄することを特徴とする請求項 2 記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法。

【請求項 4】

2) のステップの高分子画分が、被検原料サンプルの水抽出液をエタノール沈殿することによって調製した高分子画分であるか、或いは、被検原料サンプルの水抽出液を透析、限外濾過、ゲル濾過により分離した高分子画分であるかを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法。

【請求項 5】

2) のステップの高分子画分が、被検原料サンプルの糖化液から調製された高分子画分であることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法。

【請求項 6】

2) のステップの水抽出高分子画分の調製に際して、抽出中に被検原料サンプルを酵素処理することを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法。

【請求項 7】

3) のステップのバッファー液として、酢酸バッファー - CaCl_2 を用いることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法。

【請求項 8】

4) のステップの酵母の沈降度合いを、O D 6 0 0 を用いた光学密度の測定により行うことを特徴とする請求項 1 ～ 7 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法。

【請求項 9】

4) のステップの酵母の沈降度合いの測定に際して、3) のステップで混合、懸濁した試験系を、15 分間以上静置し、該静置した試験系を再度混合、懸濁し、該試験系を O D 6 0 0 を用いて光学密度の継時的な変化を測定することを特徴とする請求項 8 記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法。

【請求項 10】

3) のステップで混合、懸濁した試験系を、30 分間以上静置することを特徴とする請求項 9 記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法。

【請求項 11】

4) のステップの酵母の沈降度合いの測定に際して、2) のステップにおける被検原料サンプルの代わりに、水或いは非早期凝集原料をサンプルとして用い、該サンプルについて測定した O D 6 0 0 を用いた光学密度の継時的な変化をコントロールとして、被検原料サンプルについて測定した O D 6 0 0 を用いた光学密度を比較することにより、被検原料サ

ンプルについての相対的な酵母の沈降度合いを測定することを特徴とする請求項 8 ～ 1 0 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法。

【請求項 1 2】

4) のステップの酵母の沈降度合いの測定に際して、3) のステップで混合、懸濁した試験系を、1 5 分間以上静置し、該静置した試験系を再度混合、懸濁し、該試験系を OD 6 0 0 を用いて光学密度の継時的な変化を測定する代わりに、2 分間以上静置した後の OD 6 0 0 による光学密度を測定することにより酵母の沈降度合いを測定することを特徴とする請求項 8 記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法。

【請求項 1 3】

被検原料サンプルが、大麦、麦芽、又は製麦途中の大麦であることを特徴とする請求項 1 ～ 1 2 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法。

【請求項 1 4】

被検原料サンプルの水抽出高分子画分が、麦芽粉碎物を 3 0 秒間以上、水で抽出した抽出液の高分子画分であるか、又は、大麦粉碎物或いは製麦途中の大麦粉碎物を 1 5 分間以上水で抽出した抽出液の高分子画分であることを特徴とする請求項 1 ～ 1 3 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法。

【請求項 1 5】

請求項 1 ～ 1 4 のいずれか記載の、醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法を用いることを特徴とする、醸造用原料の酵母早期凝集性の迅速判定法。

【書類名】明細書

【発明の名称】酵母早期凝集因子の迅速測定法

【技術分野】

【0001】

本発明は、ビールや発泡酒、或いはウィスキーなどの発酵麦芽飲料等の製造に用いられる醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法、及び、該測定法を用いた醸造原料の酵母早期凝集性の迅速判定法に関する。

【背景技術】

【0002】

ビールや発泡酒、或いはウィスキーなどの発酵麦芽飲料等の醸造においては、酵母による主発酵の終了時に、酵母が適度に凝集沈降する。この凝集沈降により酵母の回収が可能となる。もし、主発酵の終了時に、酵母が適度に凝集沈降しなければ、酵母の回収量が不足し、逆に凝集沈降しすぎれば発酵が進まず問題となる。この酵母の凝集は、発酵の終期になりエキスの少なくなると酵母がお互いに塊となって起こるが、この凝集により酵母は培養液より底に沈降する。この酵母自体の凝集には酵母細胞表層のレクチン様タンパク質と酵母マンナンのマンノース糖鎖の結合の関与等が報告されている (Appl. Microbiol. Biotechnol 23:197-205, 2003)。

【0003】

このように発酵麦芽飲料等の醸造において、正常な発酵工程においては、酵母の凝集沈降は酵母による主発酵の終了時に、発酵液のエキスの少なくなった時点で適度に起こるが、この酵母の凝集沈降について「早期凝集現象」と呼ばれる現象が観察されることが報告されている。この「早期凝集現象」とは、酵母による発酵工程、特に発酵後期に、酵母の資化可能な糖分がまだ発酵液中に残っているにもかかわらず、酵母が凝集して沈降してしまう現象のことをいい、この早期凝集現象により、酵母が凝集・沈降してしまうと発酵の進行が停止してしまう。したがって、この現象が見られると、発酵が不十分となり、製造された製品が規格外のものとなり、発酵麦芽飲料等の醸造において、大きな損害を蒙ることにもなる。

【0004】

この発酵麦芽飲料等の醸造の発酵工程における酵母の早期凝集現象という問題を解決すべく、その原因の解明について多くの研究が行われ、報告されており、その結果、この早期凝集現象は、原料麦に由来し、麦芽中に含まれる高分子酸性多糖類が原因であることが明らかにされている。そして、この早期凝集現象を引き起こす因子が、製麦工程において生成される場合と、原料麦中にもともと存在している場合があることが解っている (J. Inst. Brew., 97, 359-366; 日本農芸化学会誌, 71, 381, 1997; 特開平 10-179190 号公報)。従来より、大麦を原料とする発酵麦芽飲料等の醸造においては、発酵工程における早期凝集現象を避けるために、麦芽、大麦の早期凝集性の有無を確認して、早期凝集現象を引き起こさない大麦麦芽を選別し、用いることが行われてきた。

【0005】

麦芽、大麦等の早期凝集性の有無を確認するためには、従来の方法としては、発酵試験による方法が採用されてきた (K. Morimoto, et. al., Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd., 18, 63, 1975)。発酵試験は実際の醸造のスケールを小規模にした試験であり、麦汁の調製に 1 日、発酵の進行状況から麦芽、大麦中の早期凝集因子の有無を確認するのに 8 日間程度必要とした。更に、製麦前の麦類の場合は、製麦及び麦汁の調製に 7 日程度必要としたことから、合わせて半月程度の期間が、早期凝集因子の有無の確認のために必要とされた。

【0006】

この早期凝集性の有無を確認するための発酵試験の期間を短縮するために、被検原料麦に酵素を添加して原料麦を酵素処理し、得られた酵素処理物又は酵素処理物から分離された高分子画分を合成麦汁に添加して発酵試験原料とし、48 時間後の発酵試験原料の濁度を測定することにより原料麦中の早期凝集性因子の有無を判定する方法が開発された (特

開平 10-179190 号公報)。この方法により、早期凝集因子の有無の確認のための期間が大幅に短縮されたが、しかし、まだ 48 時間の発酵試験の時間が必要であり、更に、この方法も発酵試験による方法であるために、発酵設備等の設備が必要となる。したがって、発酵麦芽飲料等の醸造に際して、醸造原料の早期凝集因子の有無を確認するために、より簡便で、短期間に測定が可能な方法が開発されることが望まれていた。

【特許文献 1】特開平 10-179190 号公報。

【非特許文献 1】Appl. Microbiol. Biotechnol 23:197-205, 2003。

【非特許文献 2】K. Morimoto, et. al., Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd., 18, 63, 1975。

【非特許文献 3】J. Inst. Brew., 97, 359-366。

【非特許文献 4】日本農芸化学会誌、71、381、1997。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、ビールや発泡酒、或いはウィスキーなどの発酵麦芽飲料等の製造に用いられる醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法、及び、該測定法を用いた醸造原料の酵母早期凝集性の迅速判定法を提供すること、特に、従来法のような発酵工程を経ることなく、短期間にかつ簡便に、醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子を測定する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意研究の結果、対数増殖後期或いはそれ以降の酵母を調製し、該酵母と、麦や麦芽等の被検原料サンプルの水抽出高分子画分とを、バッファ液中で混合、懸濁し、該混合、懸濁した酵母の沈降度合いを測定することにより、従来法のような発酵工程を経ることなく、醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子を極めて短時間に測定することが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。本発明の酵母早期凝集因子の測定法においては、酵母を培養して対数増殖後期或いはそれ以降の酵母を調製して用いる必要があるが、該酵母は予め培養したものを凍結保存しておくことも可能であり、早期凝集因子の測定に際して迅速な対応をとることが可能である。

【0009】

また、本発明の測定法を行うには、被検原料サンプルの水抽出高分子画分を調製することが必要であるが、該画分は醸造原料を水抽出した後、エタノール沈殿法或いは透析、限外濾過、ゲル濾過法等の高分子画分を分離する方法により、容易に調製することができる。更に、本発明の方法においては、酵母の沈降度合いを測定するのに、OD600を用いた光学密度の測定法のような簡便かつ平易な手段で、正確に測定することが可能であり、本発明の測定法全体を簡便かつ迅速な酵母早期凝集因子の測定法とすることができる。本発明の早期凝集因子の測定法は、醸造に用いられる大麦や麦芽だけでなく、それ以外の原料穀物、或いはエキス等、全ての醸造原料の早期凝集因子の測定に適用することができる。

【0010】

すなわち具体的には本発明は、以下のステップからなることを特徴とする醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法。

- 1) 対数増殖後期或いはそれ以降の酵母を調製するステップ、
- 2) 被検原料サンプルの水抽出高分子画分を調製するステップ、
- 3) 1) のステップで調製した酵母と、2) のステップで調製した高分子画分を、バッファ液中で混合、懸濁するステップ、
- 4) 3) ステップで混合、懸濁した酵母の沈降度合いを測定するステップ（請求項 1）や、1) のステップにおいて調製した酵母が、酵母を培養し、対数増殖後期或いはそれ以降の酵母を回収したものであるか、或いは、該回収した酵母を更に凍結保存したものであるかを特徴とする請求項 1 記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法（請

求項 2) や、回収した酵母を、EDTA で洗浄することを特徴とする請求項 2 記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法 (請求項 3) や、2) のステップの高分子画分が、被検原料サンプルの水抽出液をエタノール沈殿することによって調製した高分子画分であるか、或いは、被検原料サンプルの水抽出液を透析、限外濾過、ゲル濾過により分離した高分子画分であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法 (請求項 4) や、2) のステップの高分子画分が、被検原料サンプルの糖化液から調製された高分子画分であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法 (請求項 5) や、2) のステップの水抽出高分子画分の調製に際して、抽出中に被検原料サンプルを酵素処理することを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法 (請求項 6) や、3) のステップのバッファー液として、酢酸バッファー - CaCl_2 を用いることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法 (請求項 7) からなる。

【0011】

また本発明は、4) のステップの酵母の沈降度合いを、OD 600 を用いた光学密度の測定により行うことを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法 (請求項 8) や、4) のステップの酵母の沈降度合いの測定に際して、3) のステップで混合、懸濁した試験系を、15 分間以上静置し、該静置した試験系を再度混合、懸濁し、該試験系を OD 600 を用いて光学密度の経時的な変化を測定することを特徴とする請求項 8 記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法 (請求項 9) や、3) のステップで混合、懸濁した試験系を、30 分間以上静置することを特徴とする請求項 9 記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法 (請求項 10) や、4) のステップの酵母の沈降度合いの測定に際して、2) のステップにおける被検原料サンプルの代わりに、水或いは非早期凝集原料をサンプルとして用い、該サンプルについて測定した OD 600 を用いた光学密度の経時的な変化をコントロールとして、被検原料サンプルについて測定した OD 600 を用いた光学密度を比較することにより、被検原料サンプルについての相対的な酵母の沈降度合いを測定することを特徴とする請求項 8 ~ 10 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法 (請求項 11) や、4) のステップの酵母の沈降度合いの測定に際して、3) のステップで混合、懸濁した試験系を、15 分間以上静置し、該静置した試験系を再度混合、懸濁し、該試験系を OD 600 を用いて光学密度の経時的な変化を測定する代わりに、2 分間以上静置した後の OD 600 による光学密度を測定することにより酵母の沈降度合いを測定することを特徴とする請求項 8 記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法 (請求項 12) からなる。

【0012】

更に、本発明は、被検原料サンプルが、大麦、麦芽、又は製麦途中の大麦であることを特徴とする請求項 1 ~ 12 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法 (請求項 13) や、被検原料サンプルの水抽出高分子画分が、麦芽粉碎物を 30 秒間以上、水で抽出した抽出液の高分子画分であるか、又は、大麦粉碎物或いは製麦途中の大麦粉碎物を 15 分間以上水で抽出した抽出液の高分子画分であることを特徴とする請求項 1 ~ 13 のいずれか記載の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法 (請求項 14) や、請求項 1 ~ 14 のいずれか記載の、醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法を用いることを特徴とする、醸造用原料の酵母早期凝集性の迅速判定法 (請求項 15) からなる。

【発明の効果】

【0013】

ビールや発泡酒、或いはウイスキーのような発酵麦芽飲料等の醸造の発酵工程において発生する酵母の早期凝集現象は、それらの製品の品質に重大な影響を及ぼす。したがって、発酵麦芽飲料等の醸造に際して、醸造に用いる原料の早期凝集因子の有無を測定し、該原料の早期凝集性を判定することは極めて重要なことである。本発明の酵母早期凝集因子

の迅速測定法によれば、発酵麦芽飲料等の醸造に際して、醸造に用いる原料の早期凝集因子の有無を、従来法のような発酵法によらず、簡便な手段で、迅速かつ正確に測定することが可能であり、例えば、醸造に用いられる大麦や麦芽のような醸造原料の早期凝集因子の有無を約3時間というような短い時間で、正確かつ再現性よく測定・判定することが可能となる。したがって、発酵麦芽飲料等の醸造に際して用いる、醸造原料の早期凝集性の実用的な測定・判定方法として極めて有用なものである。

【0014】

また、本発明の迅速測定法は、麦芽、或いは製麦前的大麦はもとより、収穫直後の大麦、又は製麦途中の大麦、或いは、醸造に用いられるその他の穀類やエキス等における早期凝集因子の測定に適用することができ、簡便、迅速、かつ確実な方法として、広くこれらの醸造原料における早期凝集因子の有無の判定に用いることが可能なものである。更に、本発明の測定法は、少量のサンプルで測定が可能であることから、発酵麦芽飲料等の醸造に際して、簡便に用いることができると共に、精度の良い実用的な測定・判定方法として提供されるものである。また、本発明の早期凝集因子の測定法は、各々の原料ごとに早期凝集因子の測定を正確に把握することができるものであるから、各々の原料ごとの早期凝集性の判定が可能であり、また、極少量の早期凝集因子の活性も測定することが可能であることから、それぞれの醸造原料における分割された画分ごとの早期凝集因子の測定も可能であり、その早期凝集因子の精製や特定に効果的に利用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明の醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法は、以下のステップからなる。

- 1) 対数増殖後期或いはそれ以降の酵母を調製するステップ、
- 2) 被検原料サンプルの水抽出高分子画分を調製するステップ、
- 3) 1) のステップで調製した酵母と、2) のステップで調製した高分子画分を、バッファー液中で混合、懸濁するステップ、
- 4) 3) ステップで混合、懸濁した酵母の沈降度合いを測定するステップ。

【0016】

該本発明の測定法における、1) のステップにおいて、対数増殖後期或いはそれ以降の酵母を調製するには、醸造に用いられる酵母を通常用いられる酵母用培地で培養し、酵母の増殖曲線を作成し、対数増殖後期或いはそれ以降に達した酵母（通常、8℃の培養温度で、4～5日）を、遠心分離等により分離、回収する。回収した酵母は、例えば、0.1 M EDTAのようなキレート化合物溶液で洗浄しておくのが望ましい。該回収した酵母は、例えば、15%グリセロール溶液により、-80℃で凍結保存した酵母のように、予め培養、回収した酵母を凍結保存して、1) のステップの酵母として調製しておくことができる。

【0017】

本発明の測定法における、2) のステップにおいて、被検原料サンプルの水抽出高分子画分を調製するには、大麦や麦芽等の被検原料サンプルを必要により粉碎処理し、水抽出、或いは通常の糖化を行う。被検原料サンプルの水抽出を行うに際しては、特開平10-179190号公報に記載された方法に従い、被検原料サンプルを α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、 β -グルカナーゼ、プロテアーゼ等の添加によって酵素処理を行うことができる。被検原料サンプルの水抽出高分子画分を調製するに際して水抽出液から、高分子画分を分離するには、エタノール沈殿法、例えば、水抽出液に50%エタノールを添加し、沈殿を遠心分離により回収する方法、或いは、透析、限外濾過、ゲル濾過法等によって、分画、回収する方法等によって、分離、回収することができる。

【0018】

本発明の測定法における、3) のステップにおいて、1) のステップで調製した酵母と、2) のステップで調製した高分子画分を、バッファー液中で混合、懸濁するには、該バッファー液として、例えば、50 mM酢酸バッファー (pH 4～4.5) - 0.1% Ca

C1₂のような液を用いることができる。

【0019】

本発明の測定法における、4)のステップにおいて、3)ステップで混合、懸濁した酵母の沈降度合いを測定するには、OD600を用いた光学密度の測定により行うことができる。該光学密度の測定に際しては、3)のステップで混合、懸濁した試験系を、15分間以上静置し、該静置した試験系を再度混合、懸濁し、該試験系をOD600を用いて光学密度の継続的な変化を測定することにより行うことができる。該光学密度の測定に際して、更に、酵母の沈降度合いをシャープにするために、3)のステップで混合、懸濁した試験系を、30分間以上静置するのが好ましい。

【0020】

本発明の測定法における、4)のステップの酵母の沈降度合いの測定に際しては、2)のステップにおける被検原料サンプルの代わりに、水或いは非早期凝集原料をサンプルとして用い、該サンプルについて測定したOD600を用いた光学密度の継続的な変化をコントロールとして、被検原料サンプルについて測定したOD600を用いた光学密度の測定値を比較することにより、被検原料サンプルについての相対的な酵母の沈降度合いを測定することができる。また、4)のステップの酵母の沈降度合いの測定に際して、3)のステップで混合、懸濁した試験系を、15分間以上静置し、該静置した試験系を再度混合、懸濁し、該試験系をOD600を用いて光学密度の継続的な変化を測定する代わりに、2分間以上静置した後のOD600による光学密度を測定することにより酵母の沈降度合いを測定することができる。

【0021】

本発明の測定法は、醸造原料として用いられる大麦、麦芽、又は製麦途中の大麦についての簡便かつ迅速な、しかも確実な酵母早期凝集因子の測定法として有利に用いることができ、更に、醸造に用いられるその他の穀類やエキス等にも、同様に、簡便、迅速、かつ確実な早期凝集因子の測定法として適用することができる。本発明の早期凝集因子の測定法は、各々の醸造原料ごとに早期凝集因子の有無を測定することが可能であり、各々の醸造原料ごとの早期凝集性の判定が可能である。各々の醸造原料に含まれる早期凝集因子は、麦芽の場合は、麦芽粉碎物を30秒間以上、水で抽出した抽出液の高分子画分として抽出され、大麦粉碎物或いは製麦途中の大麦の場合は、該原料の粉碎物を15分間以上水で抽出した抽出液の高分子画分として抽出される。したがって、該高分子画分について、本発明の方法を適用すれば、該醸造原料における早期凝集因子の有無を判定することができる。

【0022】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

【0023】

[実験方法]

1) 酵母の培養

YEPG培地(1% Yeast Extract、2% Bacto pepton、7.5% Maltose、2.5% Glucose)で、20℃静置培養で3日間培養した前培養液を、あらかじめ8℃に冷却しておいたYEPG培地(通常は250ml容メデイウムビンに培地100ml)に1.5%濃度で添加し、スターラーで攪拌しながら8℃で培養した。培養時、経時的にOD600を測定し、酵母の増殖曲線を作成し、対数増殖期、増殖曲線がねはじめた対数増殖後期(培養開始4日目)、定常期初期のそれぞれの酵母を用いた。

2) 試験用酵母の調製

培養の終了した酵母を、3000rpm、5分間(4℃)の遠心により回収した。回収した酵母は、冷水により懸濁洗浄し同様に遠心により回収し、冷却した100mM EDTA(pH8.0)によって懸濁洗浄2回、冷水による懸濁洗浄2回行い、20mlの冷水に懸濁させた。酵母液を1/200希釈し、OD600を測定することにより酵母濃度を

測定した。また、冷水による洗浄を2回行った後、15%のグリセロール液に懸濁し、同様に酵母液のOD600を測定することにより酵母濃度を測定した後、-80℃で凍結させた。

3) 麦汁エタノール沈物画分の調製

麦芽10g或いは50gを粗粉碎し、もろみ濃度1:6で調整したコングレス麦汁(45℃:30分→1℃/1分→70℃:60分後、ろ過)を遠沈管に移し、終濃度50%にエタノールを添加した。8000rpm、10分間(4℃)の遠心により沈殿を回収し、20ml/50g麦芽(4ml/10g麦芽)の熱水で懸濁させた。懸濁液を50ml容チューブに移し、水で25ml/50g麦芽

(5ml/10g麦芽)にfill upし、8000rpm、10分間(20℃)の遠心により不要物を取り除き、上清をそれぞれの測定サンプルとした。

測定の際のコントロールとして、非早期凝集(以下、非早凝という)、及び早期凝集(以下、早凝という)麦芽から同様に調製した麦汁のエタノール沈物画分を用いた。

4) 大麦、および製麦途中大麦からの酵素調製液エタノール沈物画分の調製

大麦からの酵素調製液は、特開平10-179190号公報に記載された方法に従い、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、 β -グルカナーゼ、プロテアーゼ添加により行った。エタノール沈物画分の調製は、上記3)と同様に行った。測定の際のコントロールとして、非早凝、及び早凝大麦から同様に調製した酵素調製液のエタノール沈物画分を用いた。

5) 麦芽、大麦からの水抽出液エタノール沈物画分の調製

麦芽、あるいは大麦粉碎物5gをチューブに取り、30mlの水を加え、30秒、5分、15分、30分間それぞれ振盪した。所定の時間振盪後、7000rpm、10分間遠心し、上清を回収後、終濃度50%にエタノールを添加した。8000rpm、10分(4℃)の遠心により沈殿を回収し、2.5mlの熱水で懸濁させた。8000rpm、10分間(20℃)の遠心により不要物を取り除き、上清をそれぞれの測定サンプルとした。測定の際のコントロールとして、非早凝、及び早凝麦芽、大麦から同様に調製した水抽出液のエタノール沈物画分を用いた。

6) 麦汁中の早凝誘発物質(早凝因子)の精製、及び精製した早凝因子のゲルろ過分画

早凝因子の精製を以下の工程で行った。

【0024】

早凝麦汁によって発酵した回収酵母より、水、0.1M、0.5M、1M NaClによって順次溶出した。早凝活性を持った0.1M、0.5M NaCl溶出画分を、DEAE-Sephadex A25クロマトグラフィーにより分画した。活性画分を、再度DEAE-Sephadex A25クロマトグラフィーにより最分画した。最分画による活性画分をフェノール/クロロホルム処理によりタンパク質を除去し、精製早凝因子を取得した。精製早凝因子の分子量を測定するために、BioGel P100によるゲルろ過を行った。糖量の測定は、定法であるフェノール硫酸法により行った。

7) 活性測定

分光光度計に使用するプラスチックキュベット(10×10×45mm)に、

100mM酢酸ナトリウム(pH4.8) : 1.5ml

各種サンプル : 0.4ml

50%塩化カルシウム : 6 μ l

酵母液 : 2)で測定したOD600値から3になるように計算

水 : 全量で3mlになるように調整

のように調製し、パラフィルムで上部をシールし、決めた回数(通常は40回)上下に激しく混合した後、5分、15分、30分、60分間、室温で放置した。所定の時間放置後、沈降した酵母凝集物を爪ではじいて分散させ、測定に供したすべてのサンプルを同時に、緩やかに上下に決めた回数(通常4回)混合させ、1分ごとに5分間、あるいは、2分後にOD600により濁度を測定した。2分後に測定したOD600値は、サンプルの代わりに水を添加した際のOD600値(ブランク)を1とした際の比で表した。

【実施例 2】**【0 0 2 5】**

(酵母の増殖ステージの違いによる活性測定結果)

実施例 1 の方法 1) で記した酵母の増殖曲線、及び非早凝、早凝麦芽からの麦汁のエタノール沈殿画分をサンプルとして、増殖ステージの違う酵母を用いて活性測定を行った結果を図 1 に示した。なお、実施例 1 の方法 7) で記した混合、懸濁後の放置時間は 3 0 分で行った。図 1 から解るように、増殖曲線がねはじめた対数増殖後期以降の酵母を用いることにより、早凝性をほぼ同等に評価できることが解った。一方、対数増殖期の酵母を用いた際は、早凝性が評価できないことが解った。以上の結果を踏まえ、以後の実験は、対数増殖後期に入った酵母を用いて実験を行うことにした。

【実施例 3】**【0 0 2 6】**

(1 5 % グリセロール溶液により、- 8 0 °C で凍結保存した酵母を用いた活性測定結果)

実施例 1 の方法 2) で示した、1 5 % グリセロール溶液により凍結保存した酵母を融解し、非早凝、早凝麦芽からの麦汁のエタノール沈殿画分をサンプルとして活性測定を行った結果を図 2 に示した。なお、実施例 1 の方法 7) で記した混合、懸濁後の放置時間は 3 0 分で行った。図 2 から解るように、測定に用いる酵母は、1 5 % グリセロール中での凍結保存により、培養後すぐに調製した酵母と同様な結果が得られることが解った。

【実施例 4】**【0 0 2 7】**

(活性測定時の静置時間の違いによる結果)

正常、早凝麦芽からの麦汁のエタノール沈殿画分を用いて、実施例 1 の方法 7) で記した混合、懸濁後の放置時間の違いによる活性測定結果の比較を図 3 に示した。図 3 から解るように、3 0 分以上の放置時間により、安定した早凝性の評価ができることが解った。なお、1 5 分の放置でも早凝性はある程度測定できることも解った。以上の結果を踏まえ、以後の実験における活性測定の際の混合、懸濁後の放置時間は 3 0 分とした。

【実施例 5】**【0 0 2 8】**

(麦芽からの麦汁を用いた活性の測定)

非早凝、早凝麦芽からの麦汁のエタノール沈物画分を用いて、実施例 1 の方法 7) で述べた OD 6 0 0 による濁度の経時的な変化を図 4 に示した。早凝麦汁エタノール沈物画分添加区 (早凝区) は、非早凝区と比較して明らかに酵母の沈降による濁度の減少が速い事が解った。キュベット試験によって沈降した酵母を顕鏡した結果を図 5 に示した。早凝区は非早凝区に比べ酵母が大きな塊となっており、沈降速度が速くなったことが裏付けられた。また、両区ともに沈降は 2 分後には終了し、少なくとも 5 分後までは OD 6 0 0 が、ほぼ一定の値に維持されることがわかった。このことから、混合後 2 ~ 5 分の一定になった OD 6 0 0 値によって測定することができると解った。混合後 2 分後における早凝区の OD 6 0 0 の値を、非早凝区の値の比として求めた結果を図 6 に示した。この結果から、混合後 2 分後の測定で、早凝性が判定できることが解った。

【実施例 6】**【0 0 2 9】**

(大麦からの酵素処理液を用いた活性の測定)

非早凝、早凝大麦からの酵素処理液の、エタノール沈物画分を用いて、実施例 1 の方法 7) で述べた 2 分後の OD 6 0 0 による濁度を、早凝区の非早凝区に対する比として現した結果を図 7 に示した。この結果から、混合後 2 分後の測定で、早凝性が判定できることが解った。

【実施例 7】**【0 0 3 0】**

(麦芽、大麦の水抽出液を用いた活性の測定)

早凝麦芽、及び早凝大麦の粉碎物を、水により、3 0 秒、5、1 5、3 0 分間、それぞれ

浸透し、その抽出液をサンプルとして、実施例 1 の方法 7) で述べた 2 分後の OD 600 による濁度を、ブランクでの濁度の比としてもとめた結果を、図 8 に示した。また、非早凝、早凝麦芽、及び非早凝、早凝大麦の粉碎物を、水により 30 分間、それぞれ浸透し、その抽出液のエタノール沈殿画分をサンプルとして、実施例 1 の方法 7) で述べた 2 分後の OD 600 による濁度を、早凝区の非早凝区に対する比として現した結果を図 6、7 に示した。それらの結果から、麦芽の水抽出エタノール沈殿画分においては、30 秒で大方が抽出され、5 分間以上ではほぼ全量が抽出されるので、5 分間以上の抽出によって、早凝性の測定ができることが解った。また、大麦粉碎物の水抽出エタノール沈殿画分においては、15 分で大方が抽出され、30 分間以上ではほぼ全量が抽出されるので、30 分間以上の抽出によって、早凝性の測定ができることが解った。

【実施例 8】

【0031】

(製麦途中サンプルの酵素処理液を用いた活性の測定)

早凝麦芽になった製麦区、及び非早凝麦芽を調製した製麦区の麦おろし直後から 4 日目まで、1 日ごとにサンプリングし、それらサンプルを乾燥、粉碎し、水により 30 分間抽出し、抽出液のエタノール沈殿画分を用いた本法による測定結果を、図 9 に示した。非早凝製麦区では 4 日間を通して活性は認められず、早凝因子は生成されていないことが示された。一方、早凝麦芽生成区では、発芽 1 日目に活性が認められ、2 日目にはすでに仕上がり麦芽並みの活性、つまり早凝因子の生成が認められた。以上のことから、製麦途中のサンプルの早凝因子量をモニターするための系としても、本法は有用であることが示された。

【実施例 9】

【0032】

(早凝因子の精製工程における分画物を用いた活性測定結果)

実施例 1 の方法 6) で示した、早凝因子精製工程中の、一回目の DEAE-Sephadex A 25 クロマトグラフィーによる分画結果を図 10 に示した。この分画により、素通り (図中 OM と記載) を含めて、11 の糖のピークに分画された。

上記 11 のピークをサンプルとした、本法による測定結果を図 11 に示した。活性測定は、実施例 1 の方法 7) に記載した反応系中のサンプルを、画分と水であわせて 0.4 ml にして行った。図 11 から解るように、図 10 で示したピークの中で、図中で「5」と記載したピークに特異的に活性が認められた。以上の結果から、本法は、早凝因子の精製工程に利用できることが示された。

【実施例 10】

【0033】

(精製早凝因子の、ゲルろ過分画物の活性測定)

実施例 1 の方法 6) で記載された工程により精製された早凝因子を、BioGel P 100 によるゲルろ過を行った際の分画結果と、各画分の糖量 1 μ g 相当をサンプルとした、本法による測定結果を図 12 に示した。図 12 から解るように、供した糖は対称性をもった一つのピークとして分画され、精製された多糖であることが解った。精製糖のピークに、本法で測定した早凝性が認められ、精製物が早凝因子であることが示された。以上の結果から、本法は、1 μ g という極少量の早凝因子の早凝活性も測定できる系であることが示された。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図 1】本発明の実施例において、培養酵母のステージと早期凝集活性の測定結果の関係を示す図である。

【図 2】本発明の実施例において、培養調製時の酵母と凍結保存した酵母を用いた場合の早期凝集活性を測定比較した結果を示す図である。

【図 3】本発明の実施例において、早期凝集活性測定時の混合、懸濁後の放置時間による早期凝集活性の測定結果を示す図である。

【図 4】本発明の実施例において、早期凝集麦汁及び非早期凝集麦汁を用いた試験における継時的濁度変化について示す図である。

【図 5】本発明の実施例において、早期凝集麦汁及び非早期凝集麦汁を用いた試験における、キュベット内で沈降した酵母の写真撮影の結果を示す図である。

【図 6】本発明の実施例において、早期凝集麦芽及び非早期凝集麦芽について、エタノール沈殿を用いた場合の早期凝集活性について試験した結果を示す図である。

【図 7】本発明の実施例において、早期凝集大麦及び非早期凝集大麦について、エタノール沈殿を用いた場合の早期凝集活性について試験した結果を示す図である。

【図 8】本発明の実施例において、早期凝集麦芽及び早期凝集大麦粉碎物について、水抽出時間と早期凝集因子の抽出との関係について試験した結果を示す図である。

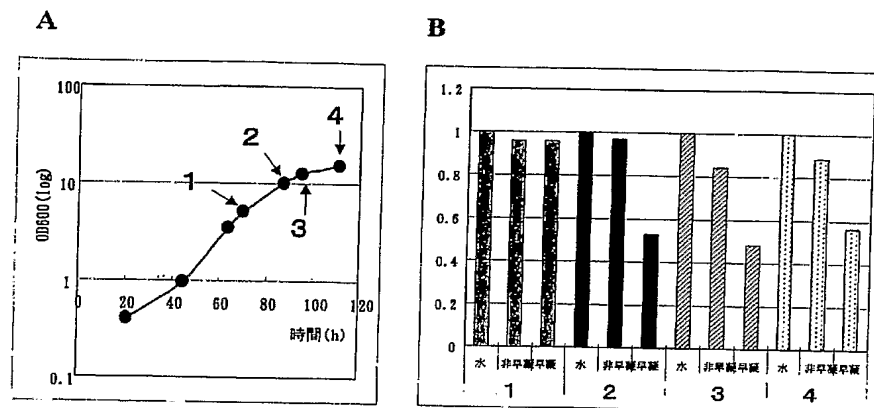
【図 9】本発明の実施例において、早期凝集麦芽及び非早期凝集麦芽について、製麦途中のサンプルを用いて早期凝集活性を測定した試験の結果を示す図である。

【図 10】本発明の実施例において、麦汁を DEAE-Sephadex A25クロマトグラフィーを用いて分画した結果の各ピークを示す図である。

【図 11】本発明の実施例において、麦汁を DEAE-Sephadex A25クロマトグラフィーを用いて分画した結果の各ピークについて、早期凝集活性の試験をした結果を示す図である。

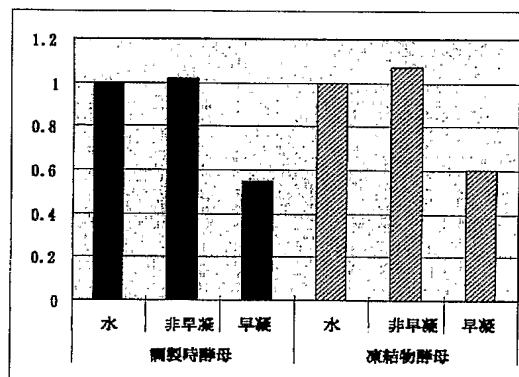
【図 12】本発明の実施例において、麦汁を DEAE-Sephadex A25クロマトグラフィーを用いて分画した早期凝集因子を、更に、BioGel P100によりゲル濾過を行った分画結果と、該画分の糖量 $1 \mu\text{g}$ 相当をサンプルとした早期凝集活性の測定結果を示す図である。

【書類名】 図面
【図 1】



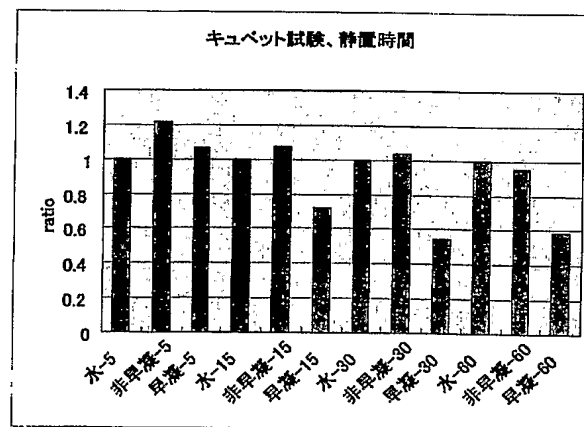
培養酵母のステージと活性測定結果の比較
(A:培養酵母の増殖曲線、B:Aで示した各ステージ(1~4)の酵母を用いた活性測定)

【図 2】



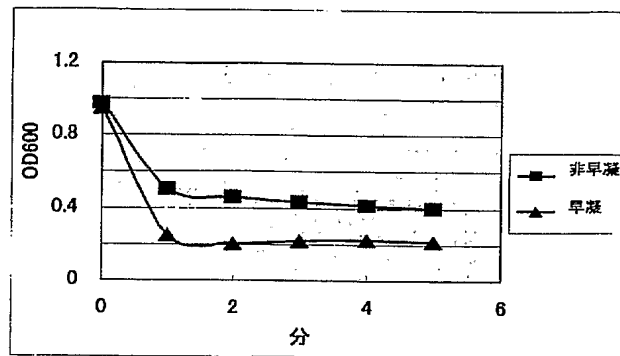
非早凝、早凝麦汁を用いた試験における経時的濁度変化
非早凝、早凝は、それぞれ正常、早凝麦汁サンプルを添加した結果であることを示す。

【図 3】



活性測定時の混合、懸濁後の放置時間による活性測定結果の比較
グラフ横軸の5、15、30、60は、それぞれ5、15、30、60分間放置した結果であることを示す。

【図4】



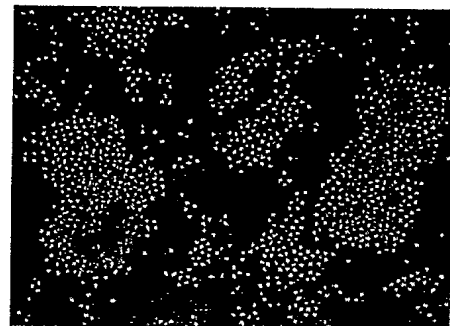
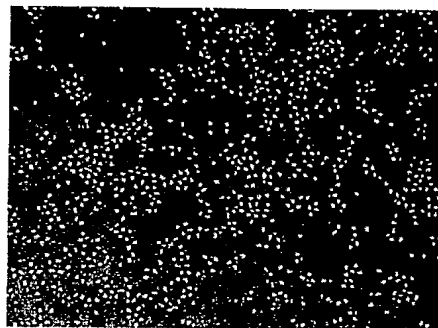
非早凝、早凝麦汁を用いた試験における経時的濁度変化

非早凝、早凝は、それぞれ正常、早凝麦汁サンプルを添加した結果であることを示す。

【図5】

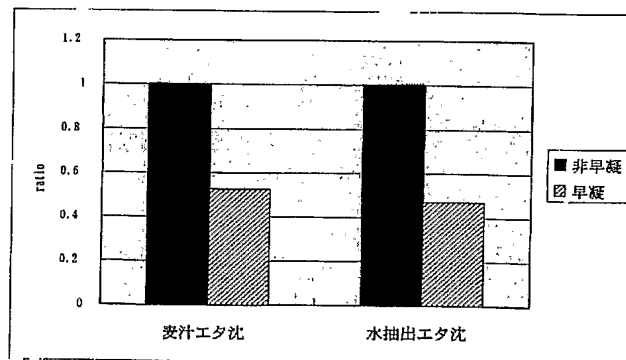
非早凝麦汁

早凝麦汁



非早凝、早凝麦汁を用いた試験における、
キュベット内で沈降した酵母

【図6】

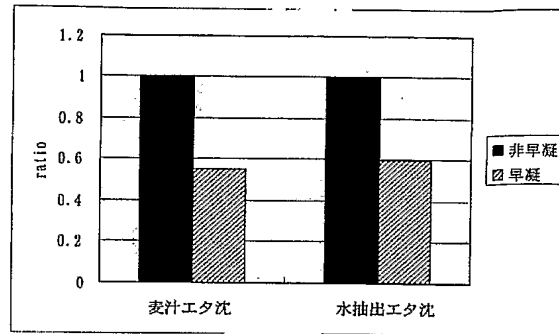


非早凝、早凝麦芽を用いた試験の結果

麦汁エタ沈: 麦汁エタノール沈物を用いた試験;

水抽出エタ沈: 麦芽粉碎物を水で抽出した抽出液のエタノール沈殿物を用いた試験

【図 7】

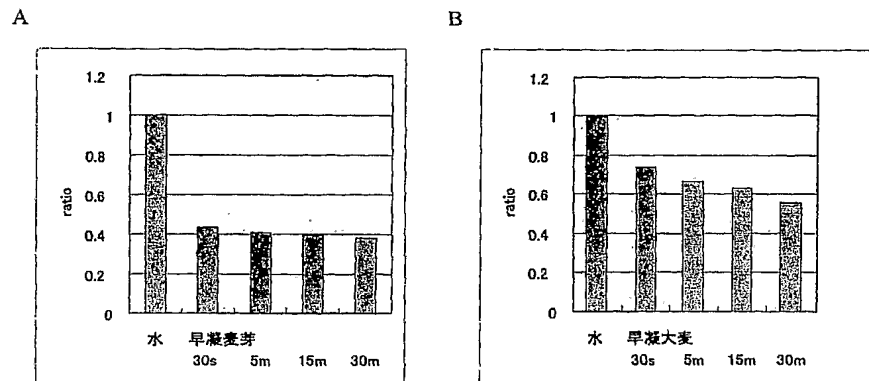


非早凝、早凝大麦を用いた試験の結果

酵素エタ沈: 大麦酵素処理液のエタノール沈物を用いた試験;

水抽出エタ沈: 大麦粉砕物を水で抽出した抽出液のエタノール沈殿物を用いた試験

【図 8】

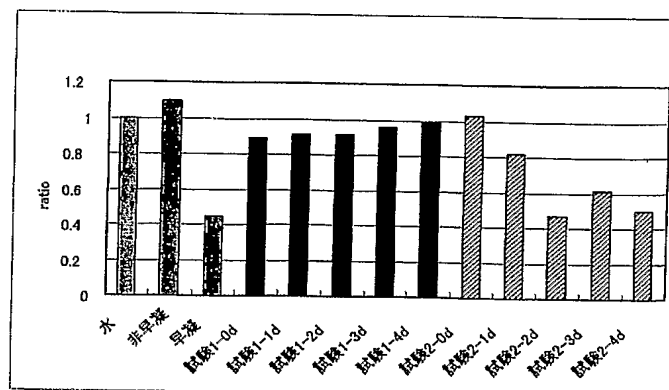


麦芽、大麦粉砕物の水抽出時間の検討結果

A: 早凝麦芽粉砕物を30秒、5、15、30分間抽出した抽出液のエタノール沈殿物を用いた結果

B: 早凝大麦を30秒、5、15、30分間抽出した抽出液のエタノール沈殿物を用いた結果

【図 9】



非早凝、早凝麦芽製麦途中サンプルを用いた測定結果

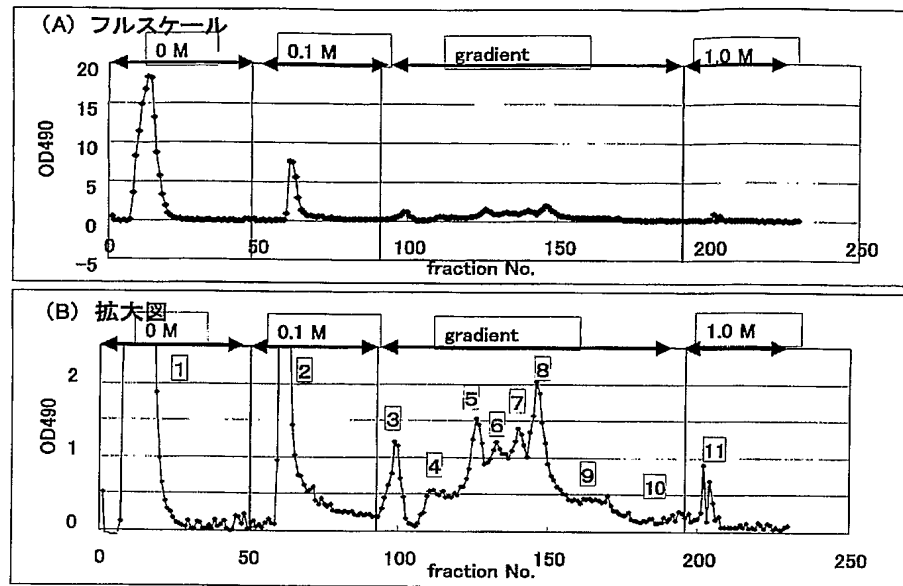
試験1、2はそれぞれの試験製麦を示す。

0d、1d、2d、3d、4dは、それぞれ麦おろし直後、麦おろし後1,2,3,4日後の製麦途中の大麦を示す。

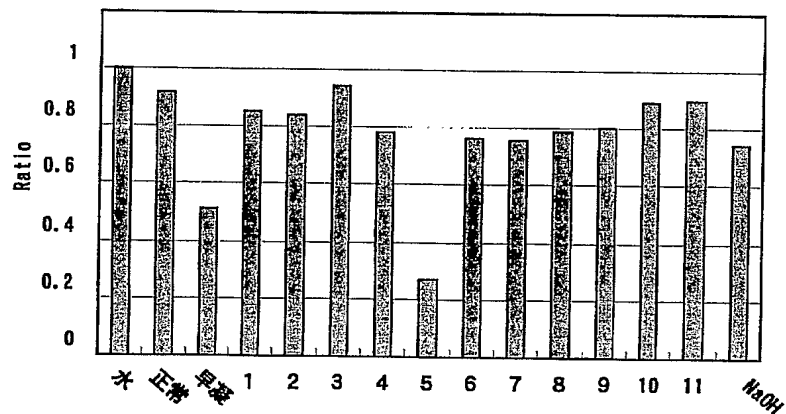
それぞれの大麦を粉砕後水抽出し、抽出物のエタノール沈殿物をサンプルとして用いた。

非早凝、早凝はそれぞれ非早凝、早凝麦芽の水抽出物を同様に処理したサンプルである。

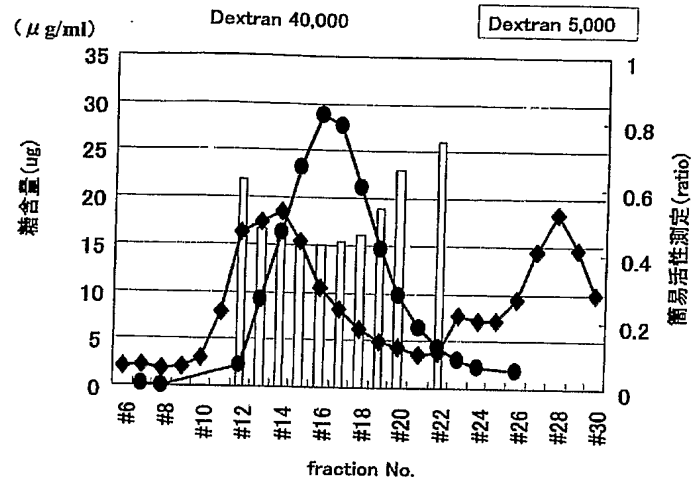
【図 10】



【図 11】



【図 12】



精製多糖のBioGel P100 によるゲルろ過のパターンと、各画分をサンプルとした測定結果

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子の迅速測定法及び該測定法を用いた醸造原料の酵母早期凝集性の迅速判定法を提供すること。

【解決手段】 対数増殖後期或いはそれ以降の酵母を調製し、該酵母と、麦や麦芽等の被検原料サンプルの水抽出高分子画分とを、バッファー液中で混合、懸濁し、該混合、懸濁した酵母の沈降度合いを測定することにより、従来法のような発酵工程を経ることなく、醸造原料中に含まれる酵母早期凝集因子を極めて短時間に、かつ少量のサンプル量で測定することができる。該被検原料サンプルの水抽出高分子画分は、醸造原料を水抽出した後、エタノール沈殿法、又は透析、限外濾過、ゲル濾過法等の手段を用いて高分子画分を分離することにより、容易に調製することができる。また、酵母の沈降度合いは、OD 600を用いた光学密度の測定法のような簡便かつ平易な手段で、正確に測定することが可能である。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-022532
受付番号	50400153723
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成16年 2月 2日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000253503

【住所又は居所】

東京都中央区新川二丁目10番1号

【氏名又は名称】

麒麟麦酒株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100107984

【住所又は居所】

東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階

廣田特許事務所

【氏名又は名称】

廣田 雅紀

【選任した代理人】

【識別番号】

100102255

【住所又は居所】

東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階

廣田特許事務所

【氏名又は名称】

小澤 誠次

【選任した代理人】

【識別番号】

100118957

【住所又は居所】

東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階

廣田特許事務所

【氏名又は名称】

岡 晴子

特願 2 0 0 4 - 0 2 2 5 3 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 2 5 3 5 0 3]

1. 変更年月日 1 9 9 5 年 6 月 1 4 日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区新川二丁目 1 0 番 1 号

氏 名 麒麟麦酒株式会社